

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q77445

Sang Yup LEE, et al.

Appln. No.: 10/662,517

Group Art Unit: 1633

Confirmation No.: 2292

Examiner: To Be Assigned

Filed: September 16, 2003

For: PROCESS FOR PREPARING SERINE-RICH PROTEIN EMPLOYING CYSTEINE
SYNTHASE (CYSK) GENE

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

Sunhee Lee
Registration No. 53,892

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: Korean 10-2003-0008689

Date: February 27, 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

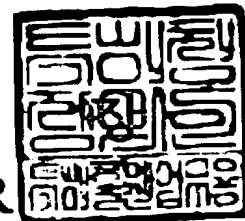
출원번호 : 10-2003-0008689
Application Number

출원년월일 : 2003년 02월 12일
Date of Application FEB 12, 2003

출원인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology

2003년 10월 27일

특허청
COMMISSIONER



온라인발급문서(발급문일자:2003.10.27 발급번호:5-5-2003-015839539)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.02.12
【발명의 명칭】	시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린 풍부 단백질의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Process for Preparing Serine-rich Protein Employing Cysteine Synthetase(cysK)
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Yup
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한미정
【성명의 영문표기】	HAN, Mee-Jung
【주민등록번호】	750220-2817339
【우편번호】	305-701
【주소】	대전광역시 유성구 구성동 한국과학기술원
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	4
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 5 면 5,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 3 항 205,000 원

【합계】 239,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 119,500 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 세린(serine) 풍부 외래 단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터 및 시스테인 합성효소 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하고, 이로부터 세린 풍부 외래 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린 풍부 단백질의 제조방법은 *cysK* 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터로 동시에 형질전환된, 재조합 미생물을 배양하고, 이로부터 외래 단백질을 수득하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 재조합 대장균을 이용한 세린 풍부 외래 단백질의 생산시, 최대 단백질 생산량에 이르는 시간을 크게 단축시킬 수 있으므로, 세린 풍부 외래 단백질의 제조수율을 향상시키는데 널리 활용될 수 있을 것이다.

【대표도】

도 4b

【색인어】

대장균, 시스테인 합성효소 유전자(*cysK*), 세린 풍부 단백질

【명세서】

【발명의 명칭】

시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린 풍부 단백질의 제조방법{Process for Preparing Serine-rich Protein Employing Cysteine Synthetase(cysK)}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 재조합 대장균을 이용한 발현유도 이전과 이후의 렙틴 단백질의 발현정도를 나타내는 그래프이다.

도 2는 플라스미드 pAC104CysK의 유전자 지도이다.

도 3은 플라스미드 pEDIL-12p40의 유전자 지도이다.

도 4a는 렙틴을 생산하는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDOb5)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 렙틴을 생산하고, *cysK* 유전자를 동시발현시키는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDOb5)(pAC104CysK)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 대장균 단백질의 아미노산 조성비를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 렙틴의 아미노산을 나타내는 그래프이다.

도 5c는 G-CSF의 아미노산 조성비 조성비를 나타내는 그래프이다.

도 5d는 인터루킨 12 β 체인의 아미노산 조성비를 나타내는 그래프이다.

도 6a는 인터루킨 12 β 체인을 생산하는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDIL-12p40)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 인터루킨 12 β 체인을 생산하고, *cysK* 유전자를 동시발현시키는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDIL-12p40)(pAC104CysK)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린(serine) 풍부 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 세린 풍부 외래 단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터 및 시스테인 합성효소 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하고, 이로부터 세린 풍부 외래 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<13> 대장균은 외래 단백질의 합성 및 생산을 위해 가장 널리 사용되는 균주로서, 재조합 기술을 이용한 인터페론(interferon), 인터루킨 2(interleukin 2), 콜로니 자극인자(colony-stimulating factor), 성장 호르몬(growth hormone), 인슐린양 성장인자(insulin-like growth factor), 인체 유래 혈청 알부민(human serum

albumin)과 같은 단백질의 제조에 활용되고 있다. 또한, 대장균 내에서 외래 단백질의 효율적인 생산을 위하여, 외래단백질을 발현하기 위한 플라스미드 벡터, 적절한 배양조건, 제조된 외래 단백질의 분해억제조건 등이 요구되고 있으며, 이를 만족시키는 다양한 발현시스템이 개발되고 있다(참조: Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol., 7:494-499, 1996)

<14> 그러나, 외래 단백질의 제조수율을 향상시키기 위하여 현재 이용되는 방법을 사용할 경우에는, 발현유도 이후에 소요되는 긴 시간으로 인하여 외래 단백질의 제조수율이 높지 않기 때문에, 이를 극복하려는 노력이 계속되고 있으나, 별다른 실효를 거두지 못하고 있는 실정이다.

<15> 따라서, 대장균에서 외래 단백질을 높은 수율로 제조할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 이에 본 발명자들은 대장균에서 외래 단백질을 높은 수율로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 대장균에서 세린 풍부 외래 단백질을 제조할 경우, 세린 풍부 외래 단백질을 암호화하는 유전자와 대장균 유래 시스테인 합성효소 유전자(*cysK*)를 동시에 발현시키면, 세린 풍부 외래 단백질의 제조수율을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<17> 결국, 본 발명의 주된 목적은 외래 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 시스테인 합성효소 유전자(*cysK*)를 포함하는 재조합 벡터로 동시에 형질전환된 재조합 미생물을 배양하고, 이로부터 목적하는 외래 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<18> 본 발명의 시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린 풍부 단백질의 제조방법은 *cysK* 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터로 동시에 형질전환된, 재조합 미생물을 배양하고, 이로부터 외래 단백질을 수득하는 단계를 포함한다. 이때, 외래 단백질은 세린 풍부 단백질(*serine-rich proteins*)을 사용함이 바람직하고, 렙틴(*leptin*) 또는 인터루킨 12 β 체인(*interleukin 12 \beta chain*)을 이용함이 더욱 바람직하다.

<19> 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기로 한다.

<20> 먼저, 본 발명에서 사용한 용어를 다음과 같이 정의하였다. 본 발명에서 '특정 아미노산 부유 단백질(*specific amino acid rich protein*)'이란 대장균내 평균 아미노산 조성(참조: Koonin et al., in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*(eds. Neidhardt, F.C. et al.) American Society for Microbiology, Washington, DC, 1432-1457, 1996)에 비해 특정 아미노산이 많은 단백질을 의미한다.

예를 들어, '세린 풍부 단백질(serine-rich protein)'은 아미노산 조성 중 세린이 10% 이상이면서 가장 많이 차지하는 순서로 두 번째 안에 포함되는 단백질로 정의하였다.

<21> 현재까지 공지된 바에 의하면, 렙틴(leptin)과 같은 세린 풍부 단백질을 대장균에서 유전자 재조합 방법으로 제조할 경우에는, 형질전환 대장균의 고농도 배양, 렙틴의 발현유도, 렙틴의 발현, 형질전환 대장균의 수득, 수득한 대장균으로부터 렙틴의 추출 등의 단계에 의하여 렙틴이 제조된다. 이때, 렙틴의 발현유도 이후로부터 형질전환 대장균의 수득에 이르는 렙틴의 발현단계에서 약 8시간 이상이 소요되는데, 이는 대장균을 고농도로 배양하면 대장균 내에서 세린계 아미노산의 합성대사가 억제되기 때문인 것으로 알려져 있다(참조: Jeong and Lee, Appl. Environ. Microbiol., 65:3027-3032, 1999).

<22> 본 발명자들은 상기한 렙틴과 같은 세린 풍부 단백질의 제조수율을 향상시키기 위하여, 세린계 아미노산의 합성을 촉진시키는 시스테인 합성효소를 암호화하는 유전자를 세린 풍부 단백질의 유전자와 동시에 발현시킬 경우, 동일한 양의 세린 풍부 단백질의 유전자만을 발현시킬 때 보다, 세린 풍부 단백질의 생산시간을 단축시킬 수 있음을 확인하였으므로, 결과적으로 제조수율을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

<23> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- <24> 실시예 1: 이차원 전기영동법을 이용한 렙틴 단백질 생산 균주의 생리적 변화 분석
- <25> 공지된 방법에 의거하여, 재조합 대장균에서의 인체 유래 렙틴 단백질 생산 대장균 BL21(DE3)(pED0b5)을 고농도로 배양하기 전과 후의 단백질 생산량을 2차원 전기영동법을 이용하여 비교하였다(참조: Hochstrasser et al., Anal. Biochem., 173:424-435, 1988; Han et al., J. Bacteriol., 183:301-308, 2001): 즉, 대장균 BL21(DE3)(pED0b5)을 초기 배양 이후에, 렙틴의 발현을 유도하고 고농도로 배양하면서, 발현유도 이전의 배양액과 발현유도 이후의 배양액을 각각 분취한 후, 각 배양물을 4℃에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여, 침전물을 수득하고, 500 μ l의 저염 완충용액(KCl 3mM, KH₂PO₄ 1.5mM, NaCl 68mM, NaH₂PO₄ 9mM)으로 세척하였다. 이어, 200 μ l TE 완충용액(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM)에 현탁하고, 초음파 파쇄기로 세포를 파괴한 후, 4℃에서 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 취하여 진공 건조시킨 다음, -20℃에 보관하여 시료를 준비하였다.
- <26> 전기 준비된 각 시료 200 μ g을 IEF 변성용액(urea 9M, CHAPS 0.5%(w/v), DTT 10mM, Bio-lyte pH 3-10 0.2%(w/v), bromophenol blue 0.001%(w/v)) 340 μ l에 용해시키고, 17cm 스트립(ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-10, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)에 넣은 다음, 20℃조건에서 12시간 동안 수화시키고, 등전점 초점법(isoelectric focusing)을 수행하였다. 그런 다음, 스트립을 평형 완충용액 I(urea 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl(pH 8.8) 0.375M, glycerol 20%(v/v), DTT 130mM)에 약 15분간 진탕하면서 침지한 다음, 다

시 평형 완충용액 II(urea 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl(pH 8.8) 0.375M, glycerol 20%(v/v), iodoacetamide 135mM, bromophenol blue 3.5M)에 약 15 분간 진탕하면서 침지하였으며, 스트립을 SDS-젤에 올려서 분자량에 의한 분리를 수행하였다.

<27> 2차원 젤은 은 염색 키트(silver staining kit, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)로 염색하였고, 1차원 젤은 스캐너(GS710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)로 스캐닝하였으며, Melanie II(Bio-Rad Laboratories Inc., USA) 소프트웨어로 단백질을 정량하였다. 또한, 단백질 동정은 2차원 젤상에서 원하는 단백질을 선별하여 적출한 다음, 세척하고, 진공 건조한 후, 트립신을 넣어 37°C에서 8시간 이상 반응시켰다. 이어, 분광광도계(Voyager™ Biospectrometry, Perseptive Biosystems Inc., USA)를 이용해서 트립신에 의한 잘린 펩타이드들의 분자량을 계측하였다. 각 시료의 계측된 결과를 MALDI-TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometer) 분석법에 적용하여, 각 아미노산의 합성량을 측정하고, 배양초기의 저농도 배양액과 배양말기의 고농도 배양액을 비교하였다.

<28> 그 결과, 고농도 배양액에서는 거의 모든 아미노산 합성이 억제되고 있음을 알 수 있었다. 특히, 아미노산 합성경로 중에서 세린계에 관련된 단백질들 (CysK, GlyA)이 렙틴 단백질 과량 생산에 의해 상당히 감소되어, GlyA는 2.5배, CysK는 2.3배 감소하였다(참조: 도 1). 이로 부터, 세린 계열 아미노산 합성경로가 렙틴 과량생산에 의해 상당히 저해됨을 알 수 있었므로, 세린 풍부 단백질인 렙틴을 생산하는 균주에서의 감소된 세린 계열 아미노산 합성관련 대사를 촉진시키기 위하여, 이 경로에 있어서 핵심효소인 CysK 단백질을 암호화하는 *cysK* 유전자를 도입하고자 하였다.

<29> 실시예 2: *cysK* 유전자를 도입한 재조합 플라스미드의 제조

<30> CysK 단백질을 발현하기 위한 재조합 플라스미드 pAC104CysK를 다음과 같이 작성하였다: 먼저, 대장균 BL21(DE3) 염색체를 주형으로 하고, 프라이머 1: 5' -gcgaattc atgagtaagatttttgaagataa-3'(서열번호 1)과 프라이머 2: 5' -gcgaattc tatatactgttgcaattctttctc-3'(서열번호 2)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 이때, 첫 번째 변성(denaturation)은 95℃에서 5분간 1회 수행하였고, 이후 두 번째 변성은 95℃에서 50초간, 교잡(annealing)은 55℃에서 1분간, 연장(extention)은 72℃에서 1분 30초간 수행하였으며, 이를 30회 반복하고, 이후 72℃에서 5분간 마지막 연장을 1회 수행하였다.

<31> 이로부터 확보된 *cysK* 유전자를 제한효소 *EcoRI*으로 절단하고, *gntT104* 프로모터(참조: Peekhaus and Conway, J. Bacteriol., 180:1777-1785, 1998)를 가진 플라스미드 p10499A(참조: Park et al., FEMS Microbiol. Lett., 214:217-222, 2002)의 동일한 제한효소 절단부위에 삽입하여 플라스미드 p104CysK를 수득하였다. 이어, 전기 수득한 플라스미드를 제한효소 *EcoRV*와 *ScaI*으로 절단하여 제한효소 *EcoRV*로 절단된 플라스미드 pACYC184에 클로닝하고, 이를 대장균 XL1-blue에 형질전환하여 재조합 플라스미드 pAC104CysK를 제조하였다(참조: 도 2).

<32> 실시예 3: 인터루킨 12 β 체인 유전자를 도입한 재조합 플라스미드의 제조

<33> 인터루킨 12 β 체인(interleukin 12 β chain, IL-12p40) 단백질을 발현하기 위하여 아래와 같이 재조합 플라스미드 pEDIL-12p40을 제작하였다: 즉, 인체 유래 인터루킨 β 체인 유전자를 포함한 플라스미드 pUC18/p40을 주형으로 하고, 프라이머 3: 5'-ggctagcattaatgatatgggaactgaagaaagat-3'(서열번호 3)과 프라이머 4: 5'-gccggatccttattaactgcagggcacaga-3' (서열번호 4)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하여 IL-12p40 유전자를 수득하고, 수득한 유전자를 제한효소 *AdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 랩틴 발현벡터(참조: Jeong and Lee, Appl. Environ. Microbiol., 65:3027-3032, 1999)에 존재하는 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*의 위치에 삽입하여 플라스미드 pEDIL-12p40을 제작하였다(참조: 도 3).

<34> 실시예 4: *cysK* 동시발현 시스템에 의한 인체 유래 랩틴 단백질의 생산

<35> 상기 실시예 2에서 제작된 재조합 플라스미드 pAC104CysK와 종래의 랩틴 발현 플라스미드 pEDOb5(참조: Jeong and Lee, Appl. Environ. Microbiol. 65, 3027-3032, 1999)로 동시에 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시켜서 대장균 BL21(DE3)(pEDOb5)(pAC104CysK)을 제조하고, 이를 배양하여 랩틴 단백질을 제조하였다. 이때, 대조군으로는 종래의 랩틴 발현 플라스미드 pEDOb5 만으로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)(pEDOb5)을 동일한 조건으로 배양하고, 이로부터 랩틴 단백질을 생산하는 것을 사용하였다.

<36> 전기 형질전환된 각 대장균을 10g/L의 포도당을 첨가한 10mL의 R/2 배지(KH_2PO_4 6.75g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g/L, 시트르산 0.85g/L, 미량금속 용액(HCl 5M, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, CaCl_2 2g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.54g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L), 5mL/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g/L)에 접종하고, 37°C에서 8시간 동안 배양한 후, 이를 다시 10g/L의 포도당을 포함한 200mL의 R/2 배지에 옮겨 37°C에서 8시간 동안 배양하였다. 이어, R/2 배지에서 배양한 재조합 대장균 200mL를 10g/L의 포도당을 포함한 1.8L의 R/2 배지에 접종하고, 37°C, pH 6.88로 유지하면서, 포도당 700g/L과 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20g/L을 포함하는 공급기질액을 공급하며 배양하였다. 이때, 기질 공급은 pH 변화에 따라서 공급되는데, 배지내 pH가 6.88이상일 때 공급기질액이 10mL/min의 속도로 발효기내의 포도당 농도가 0.7g/L이 되도록 자동 조절되어 공급되었다. 배지내 용존산소량(DO)은 40%로 유지되도록 공기 및 순수산소가 자동 조절되어 공급되었다. 배양된 배양물을 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 30일 때, 1mM의 IPTG(isopropyl- β -thiogalactoside)를 첨가하여 렙틴 단백질의 발현을 유도하였다. 모든 배양에 있어서 플라스미드의 안정적인 유지를 위해, 100 mg/L의 엠포실린과 30 mg/L의 클로람페니콜을 사용하였다.

<37> 렙틴 단백질의 발현유도 후, 1시간 간격으로 배양액을 분취하고, 각각의 분취된 배양물을 광학밀도(O.D.) 5가 되도록 일정하게 희석하며, 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 침전물을 수득하고, 전기 침전물을 TE 완충용액(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) 200 μ L에 현탁한 다음, 공지된 방법에 의하여, 12% SDS-PAGE를 수행하였다(참조: 도 4a, 도 4b). 도 4a는 대조균의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 4b는 재조합 대장균

BL21(DE3)(pEDOb5)(pAC104CysK)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프로서, (■)은 세포의 광학밀도를 나타내고, (○)은 세포건조중량을 나타내며, (▲)은 제조된 랩틴의 양을 나타낸다. 도 4a에서 보듯이, 단독적으로 발현시킨 경우에는 발현유도 이후 8시간이 경과한 시점에서 랩틴의 발현량이 최대치에 도달하고, 이로부터 제조수율이 0.457 g/L·h에 달함을 알 수 있었다. 반면, 도 4b에서 보듯이, 동시에 발현시킨 경우에는 단백질 유도 후 2시간만에 최대값에 도달하였으며, 이로부터 제조수율이 1.56 g/L·h에 달함을 알 수 있었다.

<38> 결론적으로, *cysK* 유전자 동시발현에 의해 세린 풍부 단백질을 생산하는 본 발명은, 공지된 방법보다 랩틴의 생산성을 3.4배 정도 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

<39> 실시예 5: *cysK* 동시발현 시스템에 의한 세린 풍부 단백질의 생산

<40> 공지된 바에 의하면, 대장균 내 단백질들의 평균 아미노산 조성은 루신(leucine)이 10.5%, 알라닌(alanine)이 9.6%로 가장 많이 차지하고, 세린이 평균 5.6%이다(참조: 도 5a, 도 5b, 도 5c, 도 5d). 도 5a 내지 도 5d는 지금까지 공지된 단백질의 아미노산 조성비를 나타내는 그래프로서, 도 5a는 대장균 단백질의 아미노산 조성비를 나타내고, 도 5b는 랩틴의 아미노산 조성비를 나타내며, 도 5c는 G-CSF의 아미노산 조성비를 나타내고, 도 5d는 인터루킨 12 β 체인의 아미노산 조성비를 나타낸다.

<41> 도 5b에서 보듯이, 랩틴 단백질은 전형적인 세린 풍부 단백질로서 단백질 내 세린 조성이 11.6%로 월등히 많은 세린 아미노산을 포함하고 있다. 도 5c에서 보듯이, 또 다

른 단백질인 인체 유래 과립구 콜로니 자극인자(human granulocyte-colony stimulating factor, hG-CSF)는 세린이 8.2%로 약간 많지만 대장균 내 단백질들의 아미노산 조성과 유사한 루신 19%, 알라닌 12%로 가장 많이 차지한다. 도 5d에서 보듯이, 또 다른 세린 풍부 단백질로 알려진 인터루킨 12 β 체인은 세린의 함량이 11.1%에 달한다.

<42> 본 발명자들은 전기 실시예 4의 결과가, 모든 세린 풍부 단백질의 생산에 적용될 수 있는 지를 확인하기 위하여, hG-CSF와 또 다른 세린 풍부 단백질로 알려진 인터루킨 12 β 체인을 대상으로 동일한 방법을 적용하여, 단백질을 생산하였다(참조: Jeong and Lee, Protein Expr. Purif., 23:311-318, 2001).

<43> hG-CSF의 경우, *cysK* 유전자를 동시에 발현시키지 않아도, 짧은 시간(3시간)에 최대 단백질 생산량에 도달하기 때문에, 실시예 4의 결과와 유사한 결과를 확인할 수 없었다. 그러나, 인터루킨 12 β 체인의 경우, *cysK* 유전자를 동시발현시킴으로써 렙틴과 유사한 생산성 증가효과를 얻을 수 있었다(참조: 도 6a, 도 6b).

<44> 도 6a는 인터루킨 12 β 체인을 생산하는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDIL-12p40)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 6b는 인터루킨 12 β 체인을 생산하고, *cysK* 유전자를 동시발현시키는 재조합 대장균 BL21(DE3)(pEDIL-12p40)(pAC104CysK)의 배양시, 배양시간에 따른 세포농도, 세포건조중량 및 외래 단백질 양의 변화를 나타내는 그래프로써, (■)은 세포의 광학밀도를 나타내고, (○)은 세포건조중량을 나타내며, (▲)은 제조된 인터루킨 12 β 체인의 양을 나타낸다. 도 6a에서 보듯이, 실시예 3에서 제작된 pEDIL-12p40을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 4의 방법으로 인터루킨 12 β 체인을 생산한 경우, 발현유도 7시간이 경과한 시점에서 인터루킨 12 β 체인의 발현량이 최대치에 도달하여 최대수율이 0.090

g/L·h임을 알 수 있었으나, 도 6b에서 보듯이, 실시예 2에서 제작된 pAC104CysK와 실시예 3에서 제작된 pEDIL-12p40을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 4의 방법으로 인터루킨 12 β 체인을 생산한 경우, 발현유도 2 시간 후에 최대수율(0.349 g/L·h)로 인터루킨 β 체인을 제조하였다.

<45> 결론적으로, *cysK* 유전자 동시발현에 의해 세린 풍부 단백질을 생산하는 본 발명은, 공지된 방법보다 인터루킨 12 β 체인의 생산성을 3.9배 정도 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

<46> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 예로서, 시스테인 합성효소를 과다발현시킬 수 있는 방법으로, *cysK* 유전자를 외래 단백질 발현벡터 내에 도입하거나 숙주세포의 염색체에 융합하는 것 등도 *cysK* 유전자의 발현양만 충분하다면 동일한 효과를 가져올 수 있음은 당업계 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<47> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 세린(serine) 부유 외래 단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터 및 시스테인 합성효소 유전자를 포함하는 발현벡터로

형질전환된 미생물을 배양하고, 이로부터 세린 풍부 외래 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 시스테인 합성효소 유전자를 이용한 세린 풍부 단백질의 제조방법은 *cysK* 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터로 동시에 형질전환된, 재조합 미생물을 배양하고, 이로부터 외래 단백질을 수득하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 재조합 대장균을 이용한 세린 풍부 외래 단백질의 생산시, 최대 단백질 생산량에 이르는 시간을 크게 단축시킬 수 있으므로, 세린 풍부 외래 단백질의 제조수율을 향상시키는데 널리 활용될 수 있을 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

cysK 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터로 동시에 형질전환된 재조합 미생물을 배양하고, 이로부터 외래 단백질을 수득하는 단계를 포함하는, 외래 단백질을 제조하는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

외래 단백질은 세린 풍부 단백질(*serine-rich proteins*)인 것을 특징으로 하는 외래 단백질을 제조하는 방법.

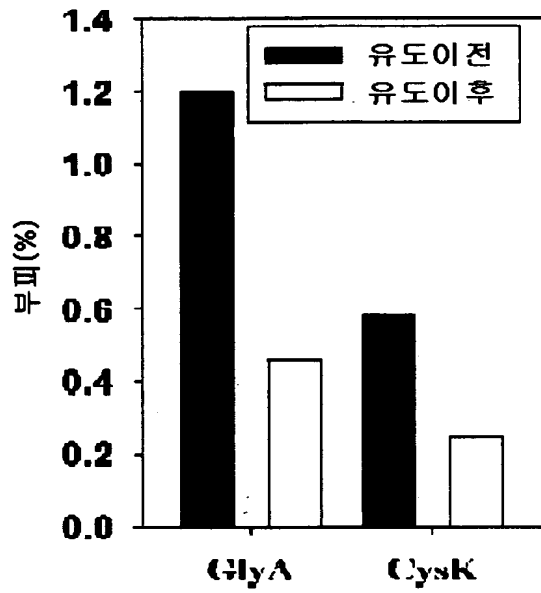
【청구항 3】

제 2항에 있어서,

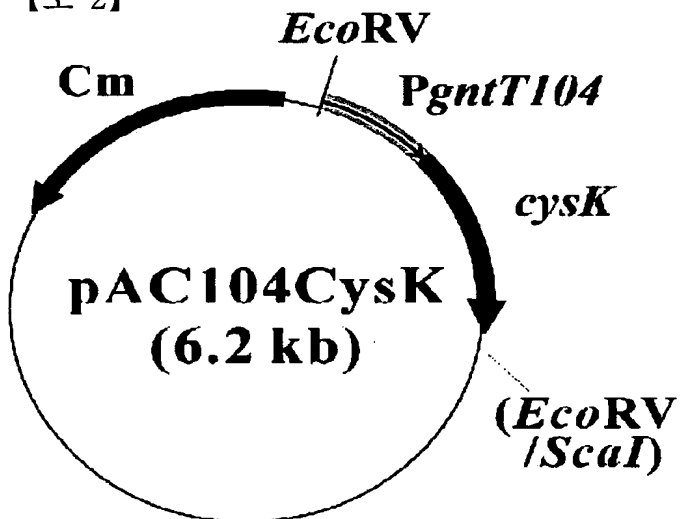
세린 풍부 단백질은 렙틴(*leptin*) 또는 인터루킨 12 β 체인(*interleukin 12 β chain*)인 것을 특징으로 하는 외래 단백질을 제조하는 방법.

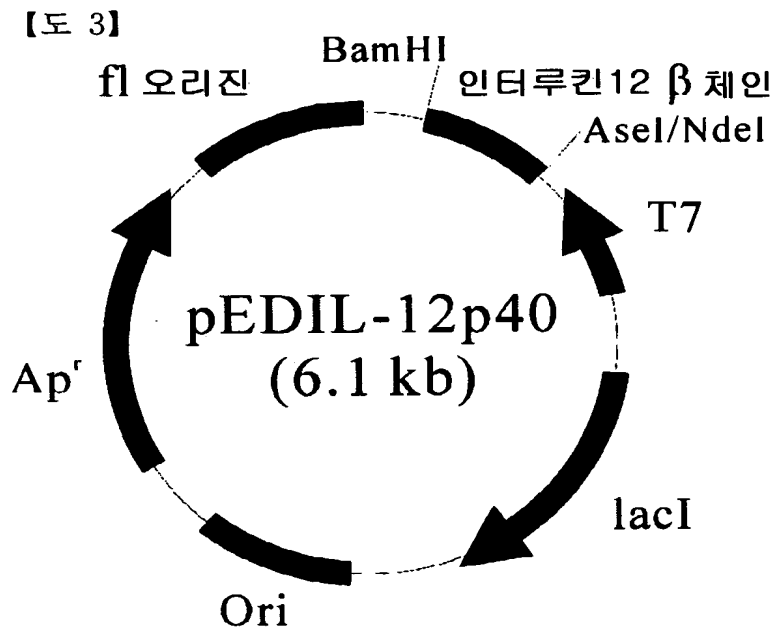
【도면】

【도 1】

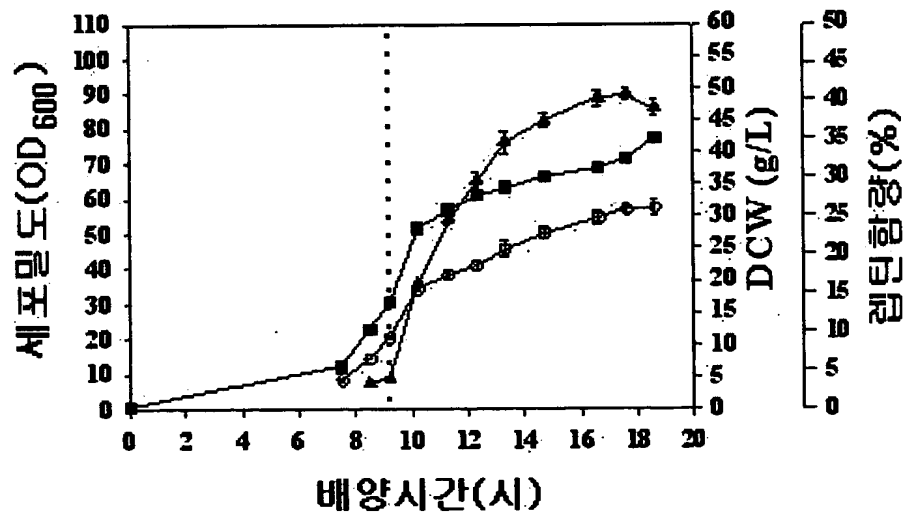


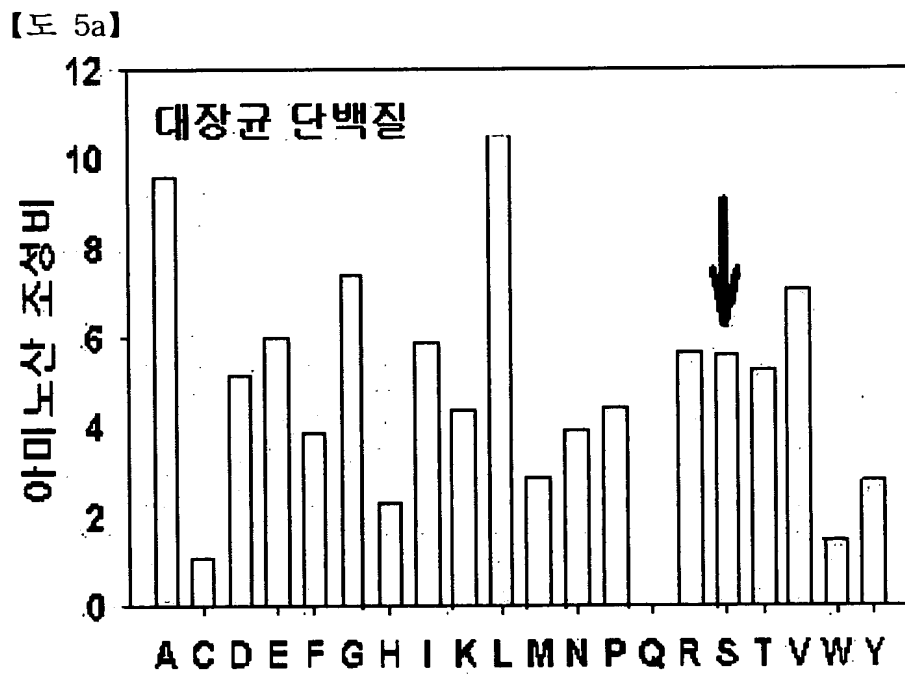
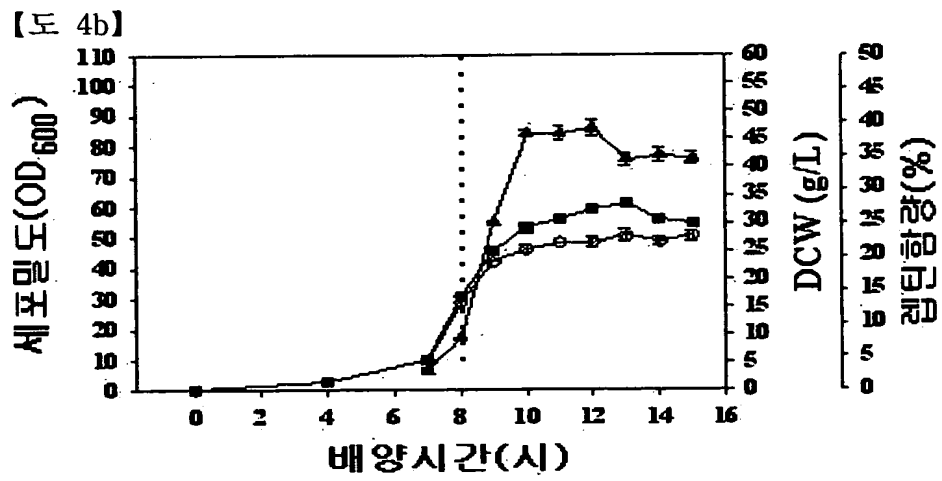
【도 2】



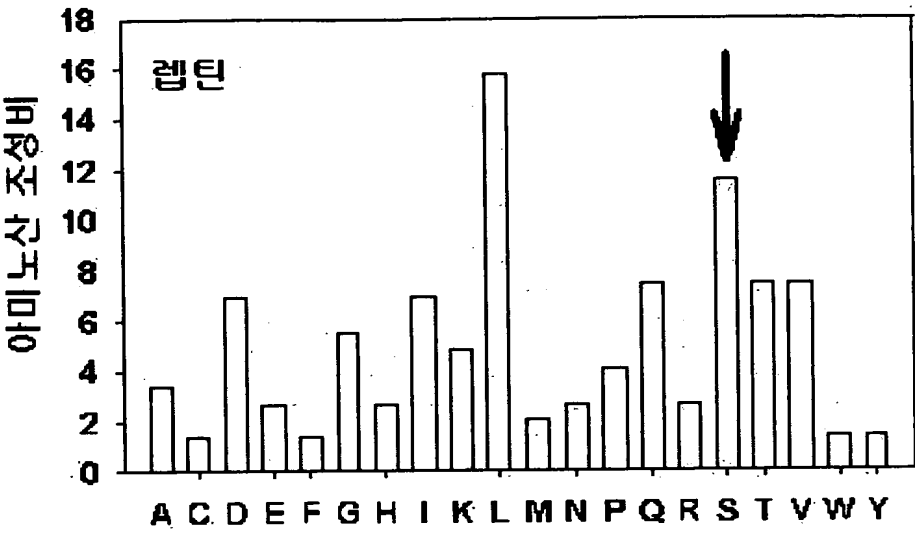


【도 4a】

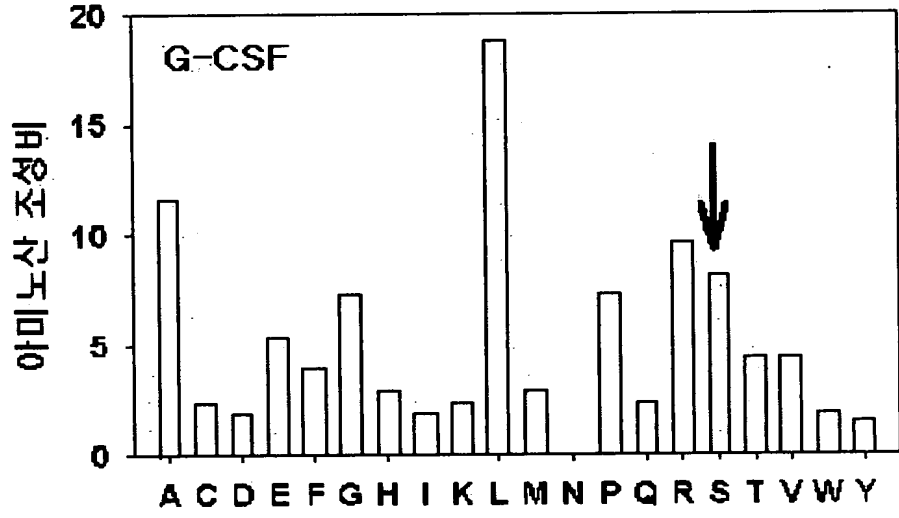




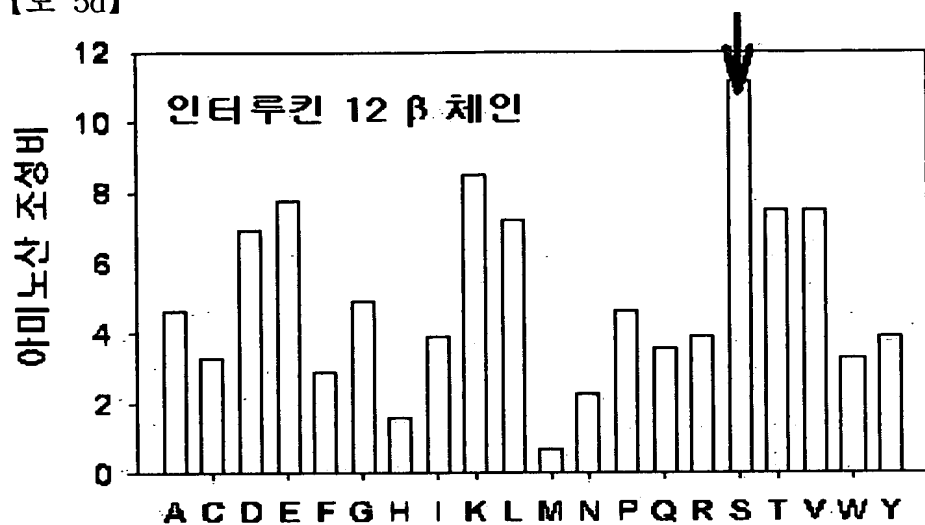
【도 5b】



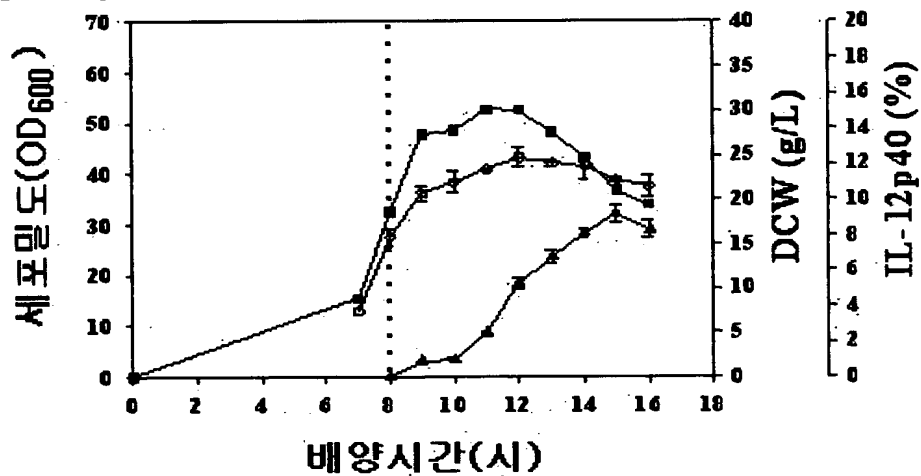
【도 5c】

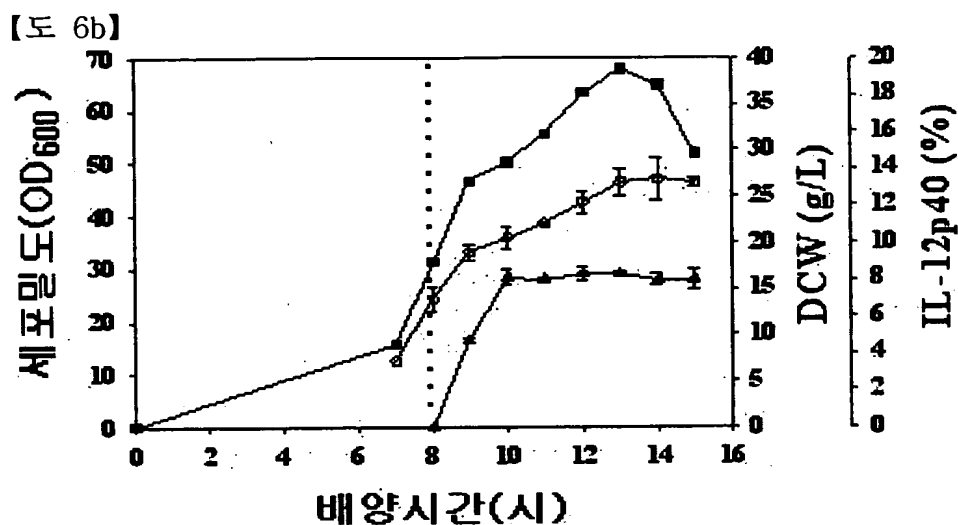


【도 5d】



【도 6a】





【서열목록】

<110> Korean Advanced Institute of Science and Technology <120> Process for
Preparing Serine-rich protein Employing *cysK* <160> 4 <170> KopatentIn 1.6

<210> 1 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 1 <400> 1 gcgaattcat gagtaagatt tttgaagata a

31 <210> 2 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 2 <400> 2 gcgaattcta tatactgttg caattctttc tc

32 <210> 3 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 3 <400> 3 ggctagcatt aatgatatgg gaactgaaga aagat

출력 일자: 2003/10/27

35 <210> 4 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 4 <400> 4 gccggatcct tattaactgc agggcacaga

30